

PCT/FR00/00013
9/88930913

EJU

REC'D 04 FEB 2000	
WIPO	PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 26 JAN. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **20 JAN 1999**

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **99 00588**

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75**

DATE DE DÉPÔT **20 JAN 1999**

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention ☐ certificat d'utilité n°

☐ différé ☒ immédiat

Établissement du rapport de recherche

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET LAVOIX
2 Place d'Estienne d'Orves
75441 PARIS CEDEX 09

n° du pouvoir permanent **BFF 98/0466** références du correspondant **53-20-14-20** téléphone

date

Procédé de criblage utile pour identifier des ligands potentiels pour un récepteur capable de s'internaliser.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)

Forme juridique

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

101 Rue de Tolbiac, 75013 PARIS

Pays **FR**

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs ☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES ☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire)

CABINET LAVOIX
M. NONCHENY n° 92.1179
A. Nonchény

SIGNATURE DU PREPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Gm

La présente invention a pour objet un procédé de criblage applicable à l'identification de ligands potentiels pour un récepteur capable de s'internaliser.

5 L'invention concerne plus particulièrement, mais non exclusivement les récepteurs appartenant à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G ainsi que ceux de la famille des récepteurs tyrosine kinase à un seul domaine transmembranaire.

10 A ce jour, environ 800 récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR) ont été clonés de différentes espèces eucaryotes. Chez l'homme, 240 GPCRs ont été isolés. Pour seulement 140 d'entre eux le ligand endogène est connu, pour les 100 autres restants qui constituent le pool des récepteurs orphelins, ils sont à identifier.

15 Parallèlement, plusieurs centaines de nouveaux médicaments agissant sur les GPCRs ont été enregistrés, au cours de ces vingt dernières années.

En conséquence, les récepteurs orphelins nouvellement clonés sont d'un grand intérêt pour la recherche pharmaceutique dans la mesure où
20 ils sont susceptibles de représenter des cibles thérapeutiques potentielles. Toutefois, leur valorisation sur un plan thérapeutique implique au préalable d'isoler leur ligand endogène et, par là même, d'élucider leur fonction.

Sur l'ensemble de ces récepteurs orphelins couplés aux protéines G, seuls 5 ligands endogènes ont à ce jour été isolés, tous appartenant à des
25 familles de peptides nouveaux : les orexines / hypocrétines, la nociceptine / orphanine, le PrRP, peptide libérant la prolactine, l'apeline et le peptide de type leucokinin (leucokinin-like).

Pour les identifier, les auteurs ont criblé dans tous les cas des fractions de tissus purifiées sur différents tests.

30 Pour le choix des tests, ils ont mis à profit le fait que lorsque l'agoniste se fixe sur son récepteur, il y a formation d'un second messager qui va produire, suivant la voie de signalisation utilisée par le récepteur, différents

produits et qui va dans tous les cas aboutir à un changement de pH intracellulaire.

Dans le cas de la nociceptine, les auteurs ont mesuré l'accumulation d'AMPc, résultant de la stimulation de l'adénylate cyclase.

5 Dans le cas des orexines, les auteurs ont mesuré l'accumulation de Ca^{2+} intracytoplasmique résultant de la stimulation de la phospholipase C.

Dans le cas du PrRP, les auteurs ont mesuré la formation d'acide arachidonique résultant de la stimulation de la phospholipase A2.

10 Dans le cas de l'apeline, ils ont mesuré les modifications de l'acidification du milieu extracellulaire à l'aide d'un "cytosenseur".

Toutefois, l'ensemble de ces voies d'identification n'est pas totalement satisfaisant pour les raisons suivantes :

15 La démarche d'identification consistant à évaluer la production de seconds messagers nécessite de connaître la voie de signalisation du récepteur. En présence d'un récepteur orphelin, n'ayant aucune idée de la voie mise en jeu, il s'avère nécessaire de tester l'ensemble des voies de signalisation connues avec l'espoir que le récepteur d'intérêt ne soit pas couplé à une voie encore inconnue. Ceci nécessite donc de disposer d'une quantité
20 d'échantillon importante. Cette démarche implique également que le récepteur d'intérêt soit couplé à une cascade de seconds messagers dans les systèmes de transfection hétérologues dans lesquels ils sont exprimés, ce qui n'est pas nécessairement le cas.

25 Quant à l'approche consistant à mesurer l'acidification du milieu extracellulaire, suite à la production de protons par la cellule activée, elle se heurte au problème suivant : si l'on met en présence des banques de peptides ou des fractions purifiées d'extraits de tissus avec un récepteur orphelin exprimé à la surface d'une cellule, on mesure une modification de pH extracellulaire qui résulte de la stimulation non seulement du récepteur
30 orphelin mais aussi de tous les récepteurs endogènes présents. On ne peut donc pas délimiter facilement le ligand responsable de l'activation du récepteur orphelin.

La présente invention a précisément pour objet de proposer une nouvelle méthode pour détecter et/ou identifier les ligands de récepteurs orphelins qui s'avère d'une part plus fiable que celles évoquées ci-dessus et
 5 d'autre part réalisable sur des échantillons de faibles volumes.

La méthode développée dans le cadre de la présente invention met à profit les propriétés qu'ont les récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés aux protéines G, ou les récepteurs à tyrosine kinase, de s'internaliser dans les cellules qui les expriment sous l'action de
 10 ligands agonistes. L'internalisation est un phénomène assez universel qui touche un grand nombre de récepteurs. Cette internalisation peut ainsi être visualisée en microscopie confocale, optique ou même électronique lorsque le ligand est marqué avec une molécule fluorescente ou un marqueur épitopique. Les complexes ligand-récepteurs suivent alors un cheminement intracellulaire
 15 caractéristique, qui a déjà été bien étudié. Par exemple, cette technique de marquage fluorescent ou épitopique a déjà été préconisée pour suivre le trafic intracellulaire soit :

- d'un ligand marqué, complexé à son récepteur respectif, ledit récepteur subissant une internalisation induite par son activation,
- 20 - d'une protéine impliquée dans la transduction du signal, en l'occurrence la protéine kinase C marquée,
- soit encore d'une protéine impliquée dans la désensibilisation d'un récepteur après l'activation de celui-ci, en l'occurrence la β -arestine 2
 marquée.

25 Toutefois, l'option consistant à marquer soit un ligand soit une protéine impliquée dans la transduction du signal ou encore dans la désensibilisation d'un récepteur après l'activation de celui-ci, comme la β -arestine 2 marquée n'est pas totalement fiable. Il peut en effet demeurer une ambiguïté sur l'identité du récepteur dont l'internalisation a été suivie. De plus
 30 des données récentes suggèrent que des protéines différentes peuvent être impliquées dans les mécanismes d'internalisation et de désensibilisation de

divers récepteurs. La β -arestine 2, en particulier, ne semble pas jouer un rôle universel.

Par exemple, lorsque l'on suit la mobilisation de la β -arestine couplée à l'EGFP, lors de la stimulation du récepteur orphelin par son ligand, il y a phosphorylation du récepteur qui peut alors fixer la β -arestine2-GFP mobilisée du cytoplasme à la membrane. Il y a ensuite séquestration du récepteur et internalisation. Or, dans le cas de la recherche d'un ligand endogène d'un récepteur orphelin surexprimé à la surface de cellules eucaryotes, la mise en contact avec une banque de peptides ou de fractions purifiées de tissu résulte en l'activation non seulement du récepteur orphelin mais aussi de tous les récepteurs endogènes couplés aux protéines G. Il en résulte donc une mobilisation de la β -arestine 2-GFP non seulement par le récepteur orphelin mais aussi par les récepteurs endogènes. Ceci ne permet donc pas d'identifier le ligand responsable de l'activation du récepteur orphelin.

De même, dans le cas d'une banque de peptides ou de fractions de tissus purifiées contenant le ligand endogène recherché, si tous les peptides sont marqués de façon homogène on ne peut pas identifier celui que l'on recherche.

Le procédé de criblage revendiqué a précisément pour avantage de lever cette indétermination.

Plus précisément, la présente invention concerne un procédé utile pour détecter et/ou identifier un ligand d'un récepteur d'intérêt et capable de subir une internalisation induite par la fixation dudit ligand, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes consistant à :

- exprimer ledit récepteur sous une forme marquée à la surface d'une cellule,
- mettre en présence ladite cellule avec au moins un composé peptidique, pseudopeptidique ou non peptidique susceptible d'être un ligand dudit récepteur, dans des conditions suffisantes pour permettre une internalisation cellulaire dudit complexe récepteur-ligand et

- visualiser cette internalisation via la détection du marqueur lié audit récepteur.

La présente invention implique donc le marquage du récepteur orphelin pour lequel notamment sont recherchés des agonistes potentiels.

Le fait de marquer en soit le récepteur orphelin est nettement avantageux au regard des techniques de détection évoquées ci-dessus. En effet, cette approche offre la possibilité de visualiser directement la cible étudiée. Lors de la mise en contact du récepteur avec le ligand endogène, c'est le complexe ligand-récepteur-marqueur qui est internalisé. Il n'y a pas d'ambiguïté sur l'identité du récepteur internalisé.

En ce qui concerne les marqueurs convenant à l'invention, il peut s'agir soit d'une protéine autofluorescente soit d'un marqueur épitopique susceptible d'être détecté par immunohistochimie.

Les protéines fluorescentes pouvant être mises en œuvre dans le procédé revendiqué appartiennent de préférence à la famille de la protéine fluorescente sauvage GFP et ses mutants (Ex : EGFP, EBFP et EYFP). Wang S. & Halzelrigg T. (1994) Nature, 369:400-403 ; Yang TT et al. (1996) Nucleic Acid Res, 24: 4592-4593 ; Heim R & Tsien RY (1994) Curr. Biol., 6:1, 178-182; Ormö M et al., (1996) Science, 273:1392-1395.

A titre illustratif des marqueurs non fluorescents susceptibles d'être également mis en œuvre selon l'invention, on peut tout particulièrement citer l'hémagglutinine, la polyhistidine, les protéines myc et flag et les épitopes viraux. Il existe déjà pour tous ces composés fortement immunogènes des anticorps sélectifs hautement affins dans le commerce (ex : anticorps monoclonaux antimyc, Clontech; anticorps antihémagglutinine influenza, Boehringer; anticorps anti-virus de la somatostatite vésiculaire, Clontech; anticorps anti-polyhistidine, In Vitrogen). Leur détection implique une reconnaissance du groupement antigénique par l'un de ces anticorps (dits primaires), suivi d'une visualisation de l'anticorps primaire par un anticorps secondaire provenant d'une autre espèce et marqué soit par un fluorophore,

soit par la peroxydase du raifort que l'on fera consécutivement réagir avec un substrat approprié.

Ce type de marquage est particulièrement intéressant dans la mesure où il permet une sensibilité de mesure élevée qui se traduit par la
5 détection d'une concentration de ligand de l'ordre de 10^{-8} M c'est-à-dire 100 fmoles dans 10 μ l. L'internalisation du complexe est visible en microscopie confocale voire même optique lorsque le récepteur est fortement exprimé et si le ligand est en concentration suffisante (minimum 10^{-8} M).

10 Cette internalisation est de préférence détectée par microscopie confocale et/ou optique.

Enfin, avantageusement, les autres récepteurs endogènes, non marqués, présents à la surface des cellules hôtes, même s'ils sont également internalisés, ne sont pas visibles et n'interfèrent pas au niveau de la mesure. Il
15 n'est donc noté aucun bruit de fond ce qui est particulièrement intéressant au regard de la grande sensibilité de la méthode de mesure.

Avantageusement, le procédé de criblage revendiqué s'avère adapté à l'étude de tout récepteur à condition que celui-ci possède la capacité
20 de s'internaliser.

Selon un mode privilégié de l'invention, le récepteur d'intérêt est couplé à une protéine G.

Le procédé revendiqué est particulièrement intéressant pour caractériser des ligands de récepteurs appartenant à la famille des récepteurs
25 à 7 domaines transmembranaires, les GPCRs, à la famille des récepteurs tyrosine kinase à un seul domaine transmembranaire ou à la famille des récepteurs des cytokines.

Dans le cas des GPCRs, l'étiquetage des récepteurs en C-terminal présente les avantages suivants :

30 - la maturation post-traductionnelle du récepteur n'est pas modifiée,

- la liaison des agonistes et des antagonistes ainsi que la signalisation intracellulaire sont les mêmes qu'avec le récepteur natif,
- l'internalisation des complexes ligand-récepteurs n'est pas modifiée et
- 5 - la méthode de détection de l'expression est rapide et peut être effectuée sur des cellules vivantes non fixées.

Le récepteur à étudier est couplé à un marqueur puis exprimé à la surface d'une cellule-hôte. En ce qui concerne ces deux opérations, à savoir le
10 marquage et l'expression dudit récepteur au niveau d'une cellule-hôte, elles relèvent bien entendu toutes deux des compétences de l'homme de l'art.

Généralement, on opère de la manière suivante :

La séquence de la partie codante du récepteur d'intérêt est insérée en phase, dans un vecteur d'expression, en amont ou en aval de la
15 séquence codante de la protéine fluorescente (GFP, EGFP, EBFP, EYFP) ou d'un marqueur épitopique. Ces vecteurs d'expression (de type pGFP-N1 ou pGFP-C1, N1 ou C1 indiquent la position du récepteur par rapport à la protéine soit en N-terminal, soit en C-terminal) contiennent déjà la séquence de ces marqueurs. Les cellules eucaryotes sont transfectées par une méthode
20 classique (tels que la méthode des liposomes, phosphate de calcium), puis sélectionnées pour leur résistance à un antibiotique. Dans le cas des protéines de la famille GFP, il est possible d'effectuer un tri des cellules exprimant le récepteur couplé à la protéine fluorescente par cytométrie de flux.

En ce qui concerne les cellules transformées il s'agit de cellules
25 eucaryotes comme par exemple les cellules épithéliales de reins de singe : COS-7 ; d'ovaires de hamster : CHO ; et les cellules humaines embryonnaires de rein : HEK 293).

Dans une variante du procédé revendiqué, on peut envisager d'exprimer à la surface d'une cellule, deux ou plusieurs récepteurs distincts
30 marqués respectivement par des marqueurs différents. Les deux récepteurs sont bien entendu capables de s'internaliser. Cette option offre ainsi la

possibilité de cribler sur un même échantillon et simultanément des ligands potentiels pour plusieurs récepteurs.

On peut également envisager de mettre en œuvre des cellules qui expriment naturellement le récepteur d'intérêt à étudier.

5 Conformément au procédé revendiqué, les cellules hôtes sont mises en présence d'un ligand potentiel. Pour ce faire, on met donc en contact lesdites cellules avec soit une banque de composés peptidiques, pseudo-peptidiques ou non-peptidiques, un extrait biologique ou encore des fractions purifiées d'un extrait de tissus.

10 Cette mise en contact est effectuée dans des conditions suffisantes pour permettre l'internalisation cellulaire du ou des complexes récepteur-marqueur-ligand. Ces conditions suffisantes sont bien entendu appréciées par l'homme du métier, en termes de température, de durée et de concentration. Il peut également être nécessaire de procéder à des
15 expériences répétées.

En règle générale, l'internalisation de complexes ligand-récepteur dans les cellules des mammifères est optimale à 37°C. La demi-vie moyenne du processus d'internalisation (temps requis pour que 50 % des récepteurs de surface occupés soient internalisés) est de l'ordre de 10 minutes. Ainsi, des
20 expositions au ligand de 20 à 40 minutes sont habituellement optimales pour le repérage des récepteurs internalisés, les concentrations de ligand optimales sont de l'ordre de 10 à 20 fois l'affinité du ligand pour son récepteur (K_d).

On suit par microscopie confocale ou dans le cas d'une forte expression de ce récepteur marqué, par microscopie optique, l'internalisation
25 du complexe ligand-récepteur qui se concrétise par le déplacement du marquage (fluorescent ou immunohistochimique) de la membrane de la cellule (dont l'intensité de marquage diminue) vers l'intérieur de celle-ci sous forme de vésicules.

Dans le cas d'un récepteur marqué avec une étiquette
30 fluorescente, la visualisation s'effectue directement en observant le déplacement de la fluorescence.

Dans le cas où le récepteur est marqué avec un antigène non-fluorescent, l'internalisation est visualisée en microscopie confocale après fixation des cellules et détection des épitopes antigéniques par des anticorps secondaires couplés à un fluorophore. Alternativement, les épitopes
5 antigéniques peuvent être révélés par une réaction enzymatique, ou à l'aide d'un anticorps radioactif qui se concrétise dans les deux cas par l'accumulation de dépôts opaques visibles aussi bien en microscopie photonique qu'électronique.

10 Comme évoqué précédemment, l'internalisation peut être visualisée sur une dizaine de cellules et pour un volume d'incubation très faible à savoir de l'ordre du μ l. Ces deux qualités sont particulièrement précieuses lorsque l'on ne dispose que d'une très faible quantité d'échantillon.

15 En conséquence, le procédé revendiqué s'avère tout particulièrement avantageux pour détecter et/ou identifier le ou les ligands endogènes d'un récepteur orphelin ou encore identifier de nouveaux agonistes pour un récepteur connu.

20 Etant basé sur l'observation directe d'un phénomène biologique qui touche la plupart des récepteurs GPCR ou tyrosine kinase, à savoir l'internalisation, cette méthode s'avère particulièrement utile pour la recherche des ligands des récepteurs orphelins et plus particulièrement des récepteurs des peptides, en utilisant des préparations biologiques telles que des extraits de tissu.

25 On peut également envisager d'utiliser le procédé revendiqué avec un récepteur marqué, déjà identifié et caractérisé, comme un "biosenseur", qui permettrait de détecter dans un liquide biologique la présence même à l'état de traces d'une substance toxique ou non capable de se lier sur ce récepteur.

30 La présente invention s'étend également à tout ligand d'un récepteur d'intérêt identifié à l'aide du procédé revendiqué.

Les exemples et figures soumis ci-après sont présentés à titre illustratif et non limitatif de la présente invention.

FIGURES

Figures 1 :

figure 1a : Visualisation par microscopie confocale du récepteur de la neurotensine de type 1 couplé à la protéine fluorescente EGFP (NTR1-EGFP) à la surface de cellules CHO, incubées avec du tampon seul ou avec une concentration faible (1 nM) de neurotensine de rat ou de grenouille n'induisant pas d'internalisation.

figure 1b : Visualisation de l'internalisation du récepteur NTR1-EGFP caractérisée par la formation de nombreuses vésicules fluorescentes cytoplasmique de 0,6 μ m de diamètre à l'intérieur de cellules CHO incubées avec des concentrations de neurotensine de 10 et 100 nM.

Figures 2 : Visualisation de l'internalisation du récepteur NTR1-EGFP avec ou sans lavage acide, en présence de : 10 nM de neurotensine (figure 2a) ou d'une fraction purifiée d'extrait de cerveaux de grenouille (figure 2b). Les conditions sont les mêmes qu'en figure 1, et comprennent en outre un lavage acide du ligand endogène encore lié à la surface des cellules à la fin de la période de charge.

Figure 3 : Internalisation du récepteur NTR1-EGFP en présence de 10 fractions prépurifiées d'un extrait de cerveaux de grenouille.

Figure 4 : Dosage radioimmunologique des fractions prépurifiées d'un extrait de cerveaux de grenouille en utilisant un anticorps dirigé contre la région conservée de la neurotensine.

Matériels et méthodes

1) Construction du récepteur NTR1-EGFP

La séquence codante entière du récepteur NT1 (K. Tanaka, M. Masu and S. Nakanishi (1990) Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. Neuron 4: 847-54) a été amplifiée par PCR en

utilisant deux amorces dirigées contre les extrémités 5' et 3' de la séquence codante de cet ADNc et contenant également des sites de restriction HindIII ou BamH1 5'-CTT AAG CTT ATG CAC CTC AAC AGC TCC GTG-3' (SEQ ID N°1) et 5'-TTT GGA TCC GCG TAC AGG GTC TCC CGG GT-3' (SEQ ID N°2).

5 Après digestion par les enzymes HindIII et BamH1 et purification, la séquence amplifiée a été insérée dans le vecteur d'expression pEGFP-N1 (Clontech) au niveau des sites HindIII et BamH1. La construction a été vérifiée sur un séquenceur automatique AbiPrism 377 (Perkin-Elmer) en utilisant des ddNTP fluorescents.

10

2) Transfection stable dans les cellules CHO

Les cellules CHO-K1 (American Type Culture Collection : ATCC) ont été cultivées en atmosphère humide à CO₂ 5%, dans du milieu F12 supplémenté avec 7,5% de sérum de veau foetal, 1mM de glutamine, 100
15 unités/ml de pénicilline et 100 unités/ml de streptomycine (Boehringer Mannheim). Pour établir la lignée stable exprimant ce récepteur, les cellules CHO-K1 (environ 2,6x10⁶ cellules) ont été transfectées avec 8 µg de plasmide en utilisant des liposomes cationiques (Dosper, Boehringer). Les cellules transfectées sont sélectionnées pour leur résistance à la généticine. Les
20 clones obtenus ont été triés en utilisant la cytométrie en flux qui prend en compte l'intensité de la fluorescence de chaque cellule. Une deuxième sélection a été effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence, en observant le niveau de l'expression du récepteur NTR1-EGFP fluorescent, localisée à la surface membranaire des cellules de chacun des clones.

25

3) Prépurification de l'extrait de cerveaux de grenouille

– Collection des tissus

2541 cerveaux de grenouille verte mâle (espèce *Rana ridibunda*), correspondant à un poids de tissu frais de 215 g, ont été collectés au
30 laboratoire sur des animaux fraîchement sacrifiés. Les cerveaux ont été congelés sur de la carboglace immédiatement après avoir été prélevés et conservés à -80°C.

– Extraction des tissus

Les cerveaux ont été plongés pendant 15 min dans l'acide acétique bouillant 0,5 M (2 litres), puis homogénéisés au mixeur. L'homogénat a été centrifugé à 4000 x g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant a ensuite été préfiltré sur un assemblage de 10 colonnes de Sep-Pak C18 (Waters Associates, Milford, MA) montées en série à un débit de 2 ml/min. Le matériel fixé sur les colonnes de Sep-Pak a été élué avec 20 ml d'une solution d'acétonitrile à 70%. Cette opération a été répétée 2 fois.

10

– Purification de l'extrait de cerveaux de grenouille par HPLC semi-préparative

Le matériel élué des colonnes de Sep-Pak a été partiellement évaporé afin d'éliminer l'acétonitrile, puis centrifugé à 13000 x g pendant 5 min. Le surnageant a été prélevé et divisé en 2. Chacun des 2 pools a ensuite été injecté sur une colonne semi-préparative Vydac C18 218TP1010 (1 x 25 cm) (The Separations Group, Hesperia, CA) équilibrée avec une solution d'eau/acide trifluoroacétique (99,9:0,1; vol:vol) à un débit de 2 ml/min. Le matériel peptidique fixé à la matrice a été élué en utilisant un gradient d'acétonitrile s'élevant de 14 à 42% en 40 min à un débit de 2 ml/min, puis montant de 42 à 56 % pendant 60 min à un débit de 1 ml/min. L'éluat a été collecté par fraction de 1 min et l'absorbance mesurée à 215 et 280 nm. Les fractions d'élution ont été conservées à -20°C. Avant les expériences d'internalisation, chacune des fractions a été diluée avec de l'eau, partiellement évaporée afin d'éliminer l'acétonitrile, et complétée à un volume final de 50 µl.

20

25

4) Internalisation

Les cellules sont distribuées (50 % de confluence, 20 000 cellules par puit) puis cultivées pour la nuit sur des lames multi-puits (LabTek, Nunc) prétraitées avec de la polyallylamine (0,1 mg/ml, Aldrich). Sur ces lames, le volume des incubations (sauf pour la période de charge) et des lavages est de

30

250 µl par puits. 90 min avant le début de l'expérience, le milieu des cellules est changé pour un milieu supplémenté avec de la cycloheximide (70 µM, Sigma). Les cellules sont ensuite préincubées pendant 15 min sur la glace dans du tampon Earle's froid (pH 7,4, contenant 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 3,6 mM MgCl₂, 0,1 % albumine sérique bovine, 0,01 % glucose et 0,8 mM 1,10-phénanthroline). Puis les cellules sont incubées pendant 30 min avec le ligand dilué dans 50 µl du tampon Earle's à 4°C (période de charge). A ce stade, un lot de cellules est soumis à un lavage acide hypertonique (0,2 M d'acide acétique et 0,5 mM de NaCl dans le tampon Earle's, pH 4 pendant 2 min à 4°C) afin de dissocier le ligand de ses récepteurs de surface. L'internalisation est provoquée par remplacement du milieu par du tampon Earle's à 37°C et incubation des lames à 37°C pendant 20 à 30 min (période de chasse). A la fin de l'incubation, les cellules sont rincées avec du tampon Earle's froid, fixées avec du paraformaldéhyde 4 % dissout dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4, rincées de nouveau dans du tampon Earle's froid puis montées en utilisant du Vectashield (Vector).

5) Microscopie confocale

Les cellules sont examinées avec un microscope confocal Leica TCS NT configuré avec un microscope inversé (Leica DM IRBE) équipé avec un laser argon/krypton avec des filtres d'excitation et d'émission respectivement de 488 et 530-600 nm. Des images de 1024-1024 pixels de cellules individuelles sont obtenues en utilisant un objectif 63x à immersion à huile.

6) Dosage radioimmunologique de la neurotensine sur des fractions prépurifiées d'un extrait de cerveaux de grenouille

Un volume de 5 µl de chaque fraction collectée en sortie d'HPLC semi-préparative est soumis à un dosage radioimmunologique de la neurotensine. Le dosage de la neurotensine a été effectué à l'aide d'un

anticorps dirigé contre le fragment C-terminal de la neurotensine de porc (Marcos et al., Peptides 1996, 17: 139-146).

L'anticorps est utilisé à une dilution finale de 1:50 000, et la sensibilité du dosage est de 10 pg. Le dosage radioimmunologique est effectué à 4°C dans un tampon véronal 0,02 M (pH 8,6) contenant 4% d'albumine sérique bovine et 7000 cpm de (3-[125I] iodotyrosyl) neurotensine (Amersham, Buckinghamshire, UK). Les échantillons et l'anticorps ont été incubés à 4°C pendant 48 h. La séparation de la fraction de traceur liée à l'anticorps a été réalisée par précipitation en ajoutant à chaque échantillon une solution de γ -globulines (1 % dans du tampon véronal 0,02 M) et une solution de polyéthylène glycol (20 % dans un tampon véronal 0,02 M contenant 0,1 % d'albumine sérique bovine et 0,1 % de triton X-100). Après une incubation de 20 min à température ambiante, les échantillons sont centrifugés (3 000 x g, 30 min) et les culots comptés dans un compteur gamma.

15

EXEMPLE 1 : Internalisation du récepteur NTR1-EGFP en présence de neurotensine de grenouille ou de rat

1) Caractérisation du récepteur NTR1-EGFP

Le récepteur NTR1-EGFP est exprimé de façon stable dans la lignée cellulaire CHO et ses propriétés de liaison et de transmission du signal intracellulaire ont été déterminées. L'affinité de la neurotensine s'est révélée du même ordre (0,3 nM) pour le récepteur NTR1-EGFP et le récepteur NT1 sauvage. De la même façon, le récepteur marqué conduit à la production d'inositols phosphates avec une EC50 (1 nM) identique à celle obtenue pour le récepteur NT1 sauvage (résultats non présentés).

25

2) Internalisation du récepteur NTR1-EGFP en présence de neurotensine de grenouille ou de rat

30

Les cellules incubées avec du tampon seul ou avec des concentrations faibles (concentrations inférieures à 1 nM) de neurotensine de

rat ou de grenouille présentent une fluorescence marquée du récepteur NTR1-EGFP localisée à la membrane des cellules (Fig. 1a).

L'incubation des cellules CHO-NTR1-EGFP avec des concentrations croissantes de neurotensine (gamme commençant à 10 nM) entraîne une internalisation des récepteurs NTR1-EGFP, indiquée par une diminution du marquage fluorescent membranaire et par la formation de nombreuses vésicules fluorescentes intracytoplasmiques de 0,6 μ m de diamètre (Fig. 1b). Ce type de marquage n'est pas détecté lorsque le ligand est préalablement dissocié des récepteurs de surface suite à un lavage acide effectué à la fin de la période de charge (Fig. 2a). Ces résultats indiquent que l'internalisation observée résulte de la fixation de la neurotensine sur les récepteurs membranaires pendant la période de charge.

EXEMPLE 2 : Internalisation du récepteur NTR1-EGFP en présence de fractions prépurifiées d'un extrait de cerveaux de grenouille

Dans une première série d'expériences, 0,5 μ l de chacune des 120 fractions d'élution d'un extrait de cerveaux de grenouille (prépurifié sur une colonne semi-préparative) ont été poolées par 10, donnant naissance à 12 pools de 10 fractions, chacun complété à 50 μ l avec du tampon d'Earle's. Seul le pool 2 contenant les fractions 11 à 20 entraîne l'internalisation du récepteur NTR1-EGFP.

Dans une seconde série d'expériences, les fractions du pool 2, c'est à dire les fractions 11 à 20 (0,5 μ l de volume de fraction originale dilué à 50 μ l avec du tampon d'Earle's) ont été testées individuellement. Seules les fractions 15,16,17,18 entraînent l'internalisation du récepteur NTR1-EGFP (Fig. 3). Cette internalisation n'est pas détectée si les cellules sont soumises à un lavage acide à la fin de la période de charge (Fig. 2b) indiquant que l'internalisation observée est le résultat de la fixation d'un ligand spécifique sur les récepteurs NTR1-EGFP pendant la période de charge.

EXEMPLE 3 : Dosage radioimmunologique de la neurotensine sur les fractions prépurifiées d'un extrait de cerveaux de grenouille

Le dosage radioimmunologique des fractions prépurifiées d'un
5 extrait de cerveaux de grenouille utilisant un anticorps dirigé contre la région
conservée de la neurotensine montre que le matériel immunoréactif est
exclusivement contenu dans les fractions 15,16,17,18 (Fig. 4). La quantité
totale apparente de neurotensine mesurée dans les fractions d'élution de
l'HPLC semi-préparative est de 894 ng dans 16 ml, ce qui correspond à une
10 valeur de 352 pg de peptide par cerveau de grenouille. Par conséquent, le
matériel provoquant l'internalisation du récepteur NTR1-EGFP, contenu dans
les fractions 15,16,17,18 correspond à la neurotensine endogène du cerveau
de grenouille.

En conclusion, le procédé d'internalisation décrit ci-dessus est un
15 moyen direct, simple, spécifique et fiable, permettant de détecter à partir de
l'observation d'une seule cellule une quantité de neurotensine aussi faible que
500 fmoles dans 50 μ l. Il apparaît que cette mesure est réalisable aussi bien
sur une solution pure de neurotensine que sur une fraction d'extrait de tissu
contenant non seulement la neurotensine mais aussi un grand nombre d'autres
20 neuropeptides (le nombre minimum estimé par fraction étant de 50 peptides),
avec une sensibilité similaire puisque l'on arrive à détecter, d'après le dosage
RIA, environ 250 fmoles.

REVENDICATIONS

1. Procédé utile pour détecter et/ou identifier un ligand d'un récepteur d'intérêt et capable de subir une internalisation induite par la fixation
5 dudit ligand caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes consistant à :
 - exprimer à la surface d'une cellule ledit récepteur sous une forme marquée,
 - mettre en présence ladite cellule avec au moins un composé peptidique, pseudopeptidique ou non peptidique susceptible d'être un ligand
10 dudit récepteur, dans des conditions suffisantes pour permettre une internalisation cellulaire dudit complexe récepteur-ligand et
 - visualiser cette internalisation via la détection du marqueur associé audit récepteur.
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le
15 récepteur est marqué par une protéine autofluorescente.
3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que la protéine fluorescente est une protéine de la famille de la protéine fluorescente sauvage GFP ou un de ses mutants.
4. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la
20 protéine fluorescente est choisie parmi les protéines EGFP, EBFP et EYFP.
5. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le récepteur est marqué à l'aide d'un marqueur épitopique susceptible d'être détecté par immunohistochimie.
6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que le
25 marqueur épitopique est choisi parmi l'hémagglutinine, la polyhistidine, les protéines myc et flag et les épitopes viraux.
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que l'internalisation est détectée par microscopie optique et/ou confocale.
8. Procédé selon l'une des revendications précédentes
30 caractérisé en ce que le récepteur marqué appartient à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, les GPCRs, à la famille des

récepteurs tyrosine kinase à un seul domaine transmembranaire ou à la famille des récepteurs des cytokines.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que le récepteur est couplé à une protéine G.

5 10. Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que l'on exprime à la surface d'une cellule, deux ou plusieurs récepteurs distincts marqués respectivement par des marqueurs différents.

11. Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que la cellule exprime naturellement le récepteur d'intérêt.

10 12. Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il permet la détection d'une concentration en ligand de l'ordre de 10^{-8} M.

13. Utilisation d'un procédé selon l'une des revendications précédentes pour détecter et/ou identifier le ou les ligands endogènes d'un
15 récepteur orphelin.

14. Utilisation d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 12 pour identifier de nouveaux agonistes pour un récepteur identifié.

15 15. Utilisation d'un procédé selon la revendication 14 pour détecter dans un liquide biologique la présence d'une substance capable de se
20 lier sur un récepteur identifié.

16. Ligand d'un récepteur d'intérêt, identifié par le procédé selon l'une des revendications 1 à 12.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

5

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSERM
- (B) RUE: 101 rue de Tolbiac
- (C) VILLE: Paris
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 75013
- (G) TELEPHONE: 0144236000
- (H) TELECOPIE: 0145856856

10

15 (ii) TITRE DE L'INVENTION: Procédé de criblage utile pour identifier des ligands potentiels
pour un récepteur capable de s'internaliser.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

20

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

30

- (A) LONGUEUR: 30 paires de base
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

35

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: non pertinent

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CTT AAG CTT ATG CAC CTC AAC AGC TCC GTG

30

45

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

50

- (A) LONGUEUR: 30 paires de base
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

55

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: non pertinent

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

TTT GGA TCC GCG TAC AGG GTC TCC CGG GT

30

1/4

Concentration en neurotensine**FIG.1A**

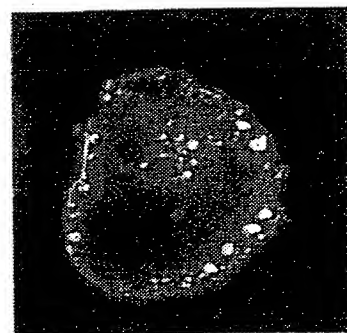
1 nM



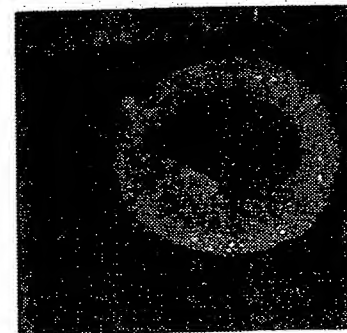
0 nM

**FIG.1B**

100 nM



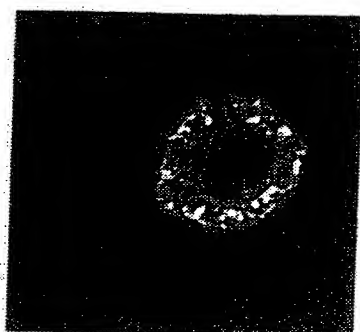
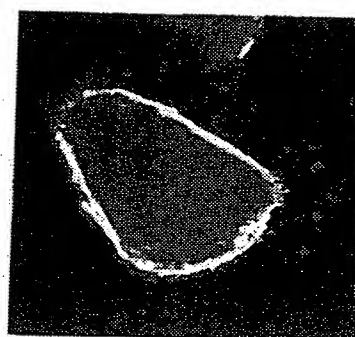
10 nM



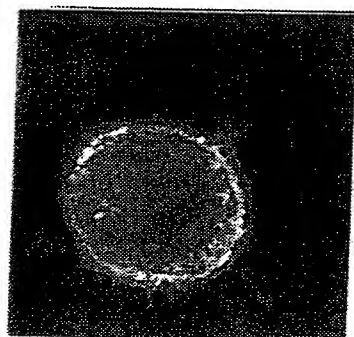
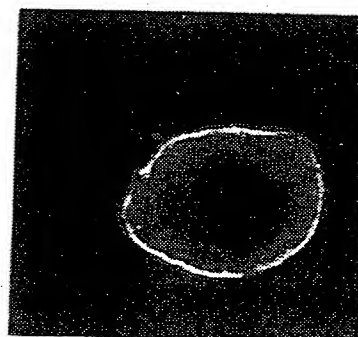
2/4

FIG.2A

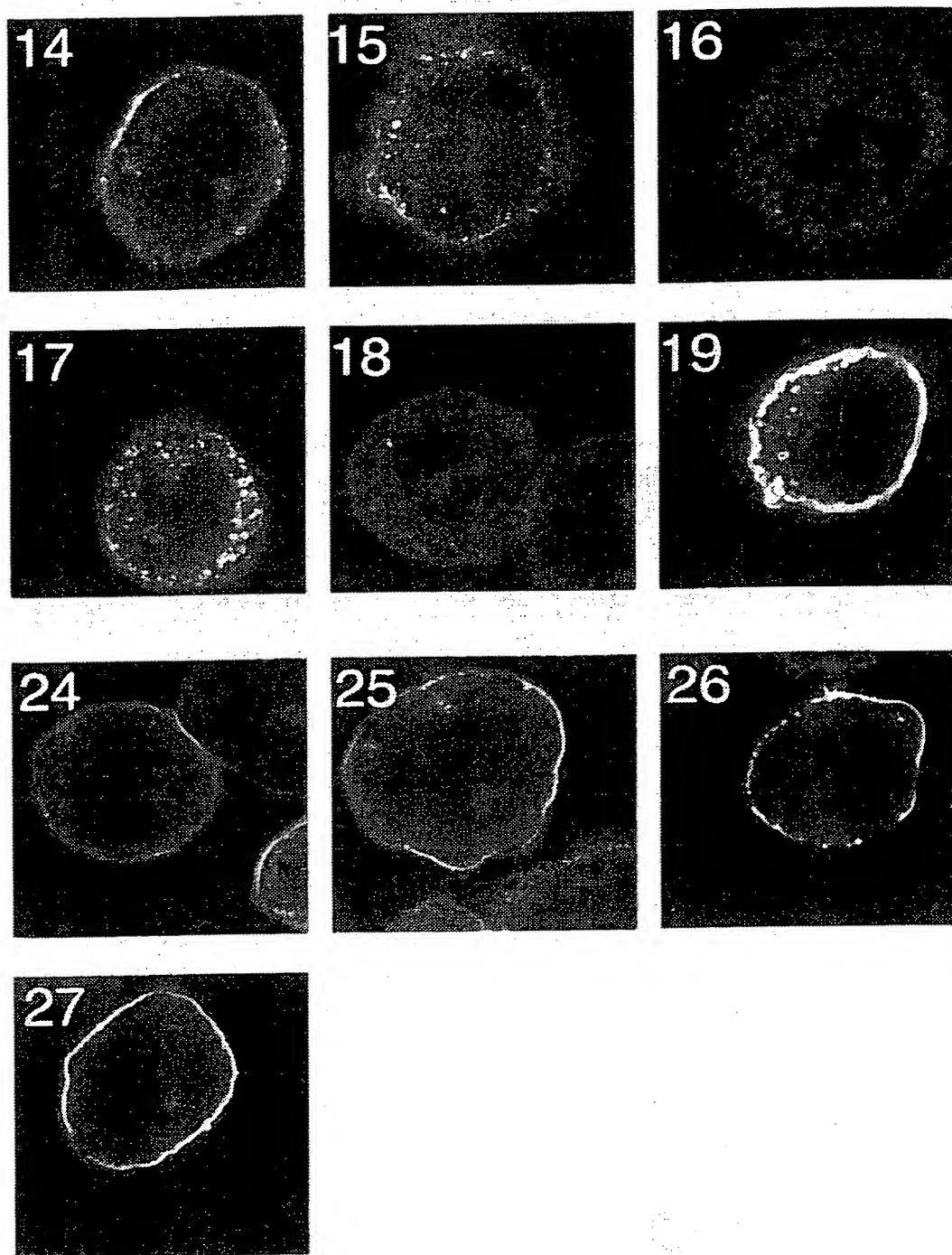
Neurotensine 10 nM

Neurotensine 10 nM
+ lavage acideFIG.2B

Fraction 17

Fraction 17
+ lavage acide

3/4

FractionsFIG.3

4/4

Dosage RIA de la neurotensine
dans les fractions HPLC

FIG.4

